1 月 January
2021，64(1)：70 – 79
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http：//www. insect. org. cn
doi：10. 16380/j. kcxb. 2021. 01. 008

# 寄生黑腹果蝇的日本开臂反颚茧蜂生物学特性及其寄生对寄主发育及免疫反应的影响

张 显，周思聪，陈佳妮，庞 兰，张启超，
王 莹，时 敏，陈学新，黄健华*

（浙江大学昆虫科学研究所，农业部作物病虫分子生物学重点实验室，杭州 310058）

**摘要：**【目的】调查寄生黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的日本开臂反颚茧蜂 *Asobara japonica* 的生物学特性，明确其寄生对寄主生长发育及免疫反应的影响。【方法】运用解剖成像和实时荧光定量 PCR 技术调查分析了日本开臂反颚茧蜂的各发育阶段发育历期、形态特征，以及日本开臂反颚茧蜂寄生黑腹果蝇 2 龄幼虫后的寄生率、出蜂率及寄主化蛹时间和寄主免疫通路 15 个主要基因（Toll 通路中的 *SPE*，*Toll*，*Myd*88，*Dif* 和 *Drosomycin*，Imd 通路中的 *PGRP-LE*，*PGRP-LC*，*imd*，*Relish* 和 *Diptericin* 及 PO 通路中的 *Spn27A*，*MP*2，*yellow-f*2，*DoxA*2 和 *PPO*1）转录水平的变化。【结果】在 25 ±1℃，相对湿度 50% ±1% 和光周期 16L∶8D 条件下，日本开臂反颚茧蜂的卵期平均为 2.38 ± 0.01 d，幼虫期为 5.36 ±0.07 d，蛹期为 8.30 ±0.04 d。日本开臂反颚茧蜂寄生黑腹果蝇 2 龄幼虫，其寄生率为 94.9% ±4.0%，出蜂率为 64.3% ±7.1%。另外，日本开臂反颚茧蜂寄生使黑腹果蝇幼虫 50% 化蛹时的化蛹时间比未被寄生对照显著延缓约 0.5 d；寄生后黑腹果蝇抗菌肽基因 *Drosomycin* 和 *Diptericin* 转录水平显著上调，而原酚氧化酶基因 *PPO*1 转录水平则显著下调。【结论】通过延缓寄主发育和抑制寄主的黑化反应，日本开臂反颚茧蜂能够在黑腹果蝇幼虫上成功寄生。本研究的结果为进一步规模化扩繁日本开臂反颚茧蜂并进行田间生物防治应用提供了理论基础。

**关键词：**日本开臂反颚茧蜂；黑腹果蝇；寄生；生长发育；免疫反应
**中图分类号：**Q966 **文献标识码：**A **文章编号：**0454-6296(2021)01-0070-10

## Biological characteristics of *Asobara japonica* (Hymenoptera: Braconidae) parasitizing *Drosophila melanogaster* and the effects of its parasitization on the host growth and immune responses

ZHANG Xian, ZHOU Si-Cong, CHEN Jia-Ni, PANG Lan, ZHANG Qi-Chao, WANG Ying, SHI Min, CHEN Xue-Xin, HUANG Jian-Hua* (Ministry of Agriculture Key Laboratory of Molecular Biology of Crop Pathogens and Insect Pests, Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Abstract:**【Aim】This study aims to investigate the biological characteristics of the parasitoid *Asobara japonica* parasitizing *Drosophila melanogaster* and to determine the effects of its parasitization on the host growth and immune responses.【Methods】The developmental duration and morphological characterastics of *A. japonica* at different developmental stages, the parasitism rate and emergence rate of *A. japonica* after parasitization on the 2nd instar larvae of *D. melanogaster*, the changes of host pupation time and

基金项目：国家重点研发计划项目（2017YFD0200400）；浙江省自然科学基金项目（LR18C140001）
作者简介：张显，男，1996 年 4 月生，安徽亳州人，硕士研究生，研究方向为害虫生物防治，E-mail：21816102@zju.edu.cn
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：jhhuang@zju.edu.cn
收稿日期 Received：2020-07-08；接受日期 Accepted：2020-07-30

transcriptional levels of 15 important genes of host in different immune pathways (*SPE*, *Toll*, *Myd*88, *Dif* and *Drosomycin* involved in Toll pathway, *PGRP-LE*, *PGRP-LC*, *imd*, *Relish* and *Diptericin* involved in Imd pathway and *Spn27A*, *MP*2, *yellow-f*2, *DoxA*2 and *PPO*1 involved in PO pathway) in the parasitized 2nd instar larvae of *D. melanogaster* were investigated and analyzed by anatomical imaging and qRT-PCR technology. 【Results】The developmental duration of egg stage, larval stage and pupal stage of *A. japonica* under the conditions of 25 ±1℃, 50% ±1% relative humidity and photoperiod of 16L∶8D was 2.38 ±0.01, 5.36 ±0.07 and 8.30 ±0.04 d, respectively. After parasitizing the 2nd instar larvae of *D. melanogaster*, the parasitism rate and wasp emergence rate of *A. japonica* were 94.9% ±4.0% and 64.3% ±7.1%, respectively. Moreover, after being parasitized by *A. japonica*, the pupation time of *D. melanogaster* with 50% pupation rate was prolonged by 0.5 d, and the transcriptional levels of the antibacterial peptide genes *Drosomycin* and *Diptericin* were up-regulated significantly, whereas that of the prophenoloxidase gene *PPO*1 was down-regulated as compared to the unparasitized control. 【Conclusion】*A. japonica* can successfully and effectively parasitize *D. melanogaster* larvae through triggering host developmental delay and suppressing host melanization immune responses. The results provide some useful information for the massive release programs of the agriculturally important parasitoid species *A. japonica*.

**Key words**: *Asobara japonica*; *Drosophila melanogaster*; parasitism; growth and development; immune response

化学农药在降低农业害虫危害、保障农产品高产和推动社会发展等方面发挥了极其重要的作用。但近些年来，由于农药不合理使用带来的许多弊端，比如环境污染、农药残留及害虫抗药性等问题，引起了全社会的广泛性关注(Li *et al*., 2018)。生物防治是指利用天敌昆虫及病原微生物等自然资源去控制害虫发生的一种环境友好、生态安全的防控技术。它能有效避免农药滥用带来的一系列问题，符合我国发展绿色农业的战略需求(古德祥等, 2000; 张俊杰等, 2015; 党英侨等, 2018)。寄生蜂是一类重要的寄生性天敌昆虫，其数量众多，约占整个昆虫种类的 10% ~20% (Whitfield, 2003)。通过大规模饲养和人工释放寄生蜂，可以有效地控制和降低害虫种群数量，达到对害虫防治的目的。我国已经有许多应用寄生蜂进行害虫防治的成功案例，比如：应用赤眼蜂对玉米螟、二化螟 *Chilo suppressalis*、甘蔗螟虫等害虫进行防治(张海燕等, 2019)；应用丽蚜小蜂 *Encarsia formosa* 减少温室害虫白粉虱的危害等等(李洪安等, 2007)。

在自然界中，有一些果蝇属 *Drosophila* 昆虫，比如斑翅果蝇 *D. suzukii*，是危害极大的浆果类水果害虫。与其他果蝇种类不同，斑翅果蝇雌虫具有锯齿状产卵器，所以它能够将卵产在即将成熟的果皮下，孵化后的斑翅果蝇幼虫通过取食果肉为生(Atallah *et al*., 2014)。斑翅果蝇原产于东南亚，近年来传入美洲和欧洲等许多国家和地区，对当地的水果产业造成了巨大的危害(Lee *et al*., 2011; Cini *et al*., 2014)。在我国四川、云南、浙江等省份都发生过斑翅果蝇危害樱桃、蓝莓、葡萄等水果，严重影响了水果产量并造成巨大的经济损失(张成林等, 2011; 张开春等, 2014)。为此，国内外生物防治领域相关研究人员一直致力于寻找能够有效降低斑翅果蝇害虫种群的寄生蜂，希望通过大量繁殖和释放技术实现对斑翅果蝇危害的持续控制。

目前，果蝇属寄生蜂的研究主要集中寄生果蝇幼虫的茧蜂科(Braconidae)寄生蜂和环腹瘿蜂科(Figitidae)寄生蜂，以及寄生果蝇蛹期的锤角细蜂科(Diapriidae)寄生蜂和金小蜂科(Pteromalidae)寄生蜂(Carton *et al*., 1986)。有研究表明，锤角细蜂科的毛锤角细蜂 *Trichopria drosophilae* 对斑翅果蝇有很高的寄生效率(Chabert *et al*., 2012)。而绝大多数幼虫寄生蜂，像环腹瘿蜂科(Figitidae) *Leptopilina* 属的异小环腹瘿蜂 *L. heterotoma* 和布拉迪小环腹瘿蜂 *L. boulardi* 都不能成功寄生斑翅果蝇。本课题组于 2018 年在浙江省台州地区(28°50′N, 120°34′E)诱捕到一种茧蜂科开臂反颚茧蜂属 *Asobara* 的果蝇幼虫寄生蜂日本开臂反颚茧蜂 *Asobara japonica*，发现其能成功寄生斑翅果蝇(Zhang *et al*., 2020)。更为重要的是，该寄生蜂种群的生殖方式为产雌孤雌生殖，即后代均为雌性。

这些特性均显示日本开臂反颚茧蜂是一种潜在的、可用于生物防治斑翅果蝇的优势寄生蜂。

日本开臂反颚茧蜂是典型的单寄生蜂,其能寄生多种果蝇属的昆虫,这有助于我们选择一种适合的替代寄主进行工厂化大规模扩繁,并用以生物防治(Ideo *et al.*, 2008)。黑腹果蝇 *D. melanogaster* 是一种模式昆虫,它具有繁殖速度快、容易饲养等优点。因此,黑腹果蝇可能是日本开臂反颚茧蜂进行大规模繁殖的最佳替代寄主。本研究针对日本开臂反颚茧蜂-黑腹果蝇这一体系,来研究寄生蜂在寄主体内的形态特征、发育历期及寄生效率等生物学特征;研究寄生蜂寄生对寄主生长发育及免疫信号通路相关基因转录水平的影响,以期能够提升日本开臂反颚茧蜂大量繁殖的能力,从而保证寄生蜂生防产品的产量和质量。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试昆虫

黑腹果蝇品系 $W^{1118}$ 从美国印第安纳大学 Bloomington 果蝇中心购买,用5.5 cm×5.5 cm 的果蝇瓶饲养。果蝇食物为常规的玉米粉配方,每 6 L 果蝇食物含:玉米粉 318 g,干酵母 120 g,琼脂粉 57 g,蛋白胨 60 g,红糖 90 g,葡萄糖 180 g,酵母提取物 60 g。日本开臂反颚茧蜂于 2018 年 6 月在浙江省台州地区用葡萄和香蕉等水果诱集,并一直饲养于本实验室。日本开臂反颚茧蜂为孤雌生殖品种,所有后代均为雌性。寄生蜂雌蜂饲养在苹果汁食物中,食物配方为:每 1 L 含 27 g 琼脂,33 g 红糖,330 mL 苹果汁,20 mL 10% 尼泊金甲酯。所有昆虫均在人工气候箱中进行饲养,黑腹果蝇饲养条件为温度 25±1℃,相对湿度 50%±1%,光周期 16L∶8D;寄生蜂饲养条件为温度 25±1℃,相对湿度 50%±1%,光周期 16L∶8D。

### 1.2 日本开臂反颚茧蜂发育历期及形态特征观测

挑取 200 头黑腹果蝇 2 龄幼虫放于含果蝇食物的果蝇瓶中,用羽化后 4 d 的日本开臂反颚茧蜂寄生,使用寄生蜂数与供试寄主幼虫数比为 1∶20,寄生 3 h 后取出寄生蜂,将寄主放于 25±1℃恒温培养箱中培养并观察。寄生后每隔 12 h 取被寄生的黑腹果蝇进行解剖,观察日本开臂反颚茧蜂在寄主体内的发育阶段,并用 KEYENCE VHX-2000C 成像系统进行拍照。依据预实验结果,初步判断寄生蜂幼虫期与蛹期分别为产卵后 2–6 d 和 7–16 d。为了进一步精确计算日本开臂反颚茧蜂各发育阶段所需的时间,我们分别在寄生蜂产卵后 1.5, 2 和 2.5 d 解剖 30 头寄主,用以统计蜂卵孵化数;分别在产卵后 6, 7 和 8 d 解剖 30 头寄主,用以统计幼虫化蛹数;分别在产卵后 15, 16 和 17 d 解剖 30 头寄主,用以统计蛹羽化数。卵期所需天数(d)=(1.5 d×卵孵化数+2 d×卵孵化数+2.5 d×卵孵化数)/卵孵化总数;幼虫期所需天数(d)=[(6 d×幼虫化蛹数+7 d×幼虫化蛹数+8 d×幼虫化蛹数)/总化蛹数]–卵期发育天数;蛹期所需时间(d)=[(15 d×蛹羽化数+16 d×蛹羽化数+17 d×蛹羽化数)/总羽化数]–幼虫期发育天数–卵期发育天数。实验重复 3 次。

### 1.3 日本开臂反颚茧蜂的寄生率及出蜂率测定

采用的实验方法同 1.2 节,实验重复 4 次,每次重复均统计每瓶内寄主果蝇化蛹数、寄主幼虫死亡数、寄主羽化数、寄生蜂羽化数以及寄主蛹死亡数,以此计算寄生率、出蜂率、寄主幼虫死亡率和寄主蛹死亡率。寄生率=[1–寄主羽化数/供试寄主幼虫数]×100%;出蜂率=(寄生蜂羽化数/供试寄主幼虫数)×100%;寄主幼虫死亡率=(寄主幼虫死亡数/供试寄主幼虫数)×100%;寄主蛹死亡率=(寄主蛹死亡数/寄主化蛹数)×100%。

### 1.4 日本开臂反颚茧蜂寄生前后寄主黑腹果蝇发育历期测定

取 50 头交配后的雌性黑腹果蝇放于果蝇瓶中产卵 3 h 左右,每次能产约 200 粒卵,待果蝇幼虫发育至 2 龄幼虫时,立即用羽化后 4 d 的日本开臂反颚茧蜂寄生,使用寄生蜂数与供试寄主幼虫数比为 1∶20,寄生 3 h 后取出寄生蜂,将寄主放于 25±1℃恒温培养箱中培养。每隔 12 h 统计每瓶化蛹数,根据每个时间点的累计化蛹数占最终化蛹数的百分比作图。实验重复 4 次,处理组为日本开臂反颚茧蜂寄生的黑腹果蝇,对照组为相近卵数且未被寄生的黑腹果蝇。

### 1.5 qRT-PCR 方法检测黑腹果蝇免疫通路相关基因的转录水平

本研究借鉴 Schlenke 等(2007)方法,在果蝇 3 个主要免疫通路,即 Toll 通路、Imd 通路和 PO 通路,各选取 5 个关键基因进行转录水平检测。其中,Toll 通路基因:*SPE* (FlyBase ID: FBgn0039102), *Toll* (FlyBase ID: FBgn0262473), *Myd*88 (FlyBase ID: FBgn0033402), *Dif* (FlyBase ID: FBgn0011274) 和 *Drosomycin* (FlyBase ID: FBgn0283461); Imd 通

路基因：*PGRP-LE*（FlyBase ID：FBgn0030695），*PGRP-LC*（FlyBase ID：FBgn0035976），*imd*（FlyBase ID：FBgn0013983），*Relish*（FlyBase ID：FBgn0014018）和 *Diptericin*（FlyBase ID：FBgn0034407）；PO 通路基因：*Spn27A*（FlyBase ID：FBgn0028990），*MP2*（FlyBase ID：FBgn0037515），*yellow-f2*（FlyBase ID：FBgn0038105），*DoxA2*（FlyBase ID：FBgn0261396）和 *PPO1*（FlyBase ID：FBgn0283437）。对被寄生后 6 与 12 h 的黑腹果蝇幼虫整虫进行取样，使用 QIAGEN RNeasy Mini Kit 提取 RNA，Vazyme HiScript Ⅱ Q RT SuperMix（Cat#Q223-01，Vazyme，南京）进行反转录获得 cDNA 第 1 链，最终使用 ChamQ SYBR qPCR Master Mix Kit（Cat#Q311-02，Vazyme，南京）在 AriaMax 实时荧光定量 PCR 仪（Agilent Technologies，CA，USA）上进行 qRT-PCR 分析。qRT-PCR 反应体系（20 μL）：SYBR-Green Mix 10 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 0.4 μL，500 ng/μL 的 cDNA 模板 0.2 μL，灭菌水 9 μL。反应条件：95℃预变性 30 s；95℃变性 10 s，57℃退火 20 s，72℃延伸 20 s，40 个循环；熔解曲线：95℃变性 15 s，60℃退火 1 min，95℃变性 15 s。*rp49*（Flybase ID：FBgn0002626）作为内参基因，使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算目的基因相对表达丰度。qRT-PCR 引物详见表 1。

**表 1　qRT-PCR 的引物序列**

**Table 1　Primers for qRT-PCR in this study**

| 引物 Primers | 引物序列（5′-3′） Primer sequences | 产物长度（bp） Product size |
|---|---|---|
| SPE-F | CATCATCCACGAGATGTATGCTCC | 156 |
| SPE-R | ATGCCGTAGTCCACAAAGTTGTT | |
| Toll-F | ATCTCAACGATAATCCCCTGGTCTG | 273 |
| Toll-R | TTACCAGTGCTTTGTCGTAGGTTCG | |
| Myd88-F | TCTGGATGCCTTTTCGATCTACTCC | 119 |
| Myd88-R | TGACATCCTTGTCGTTGATCTGAAT | |
| Dif-F | CAGAGTTCCAACCCACG | 235 |
| Dif-R | ATGAGACTGCGCTTTAGG | |
| Drosomycin-F | TACTTGTTCGCCCTCTTCGC | 194 |
| Drosomycin-R | CATCCTTCGCACCAGCACTT | |
| PGRP-LC-F | TTTTGTAACTTTAACCTTCCTGCTG | 131 |
| PGRP-LC-R | ACTCGGCTACTTTTAGGATCACC | |
| PGRP-LE-F | CGTAAGACTTATCCGTGACATGCAG | 157 |
| PGRP-LE-R | CGAGATCCTGTTGTAACCCAGAGTG | |
| imd-F | CATGAACTTCTCGAATGCCAATAAT | 110 |
| imd-R | ACTCCTCTGCGGTACTGGTGCT | |
| Relish-F | AGCTCTAATAACTCGCTGGATCTGC | 111 |
| Relish-R | GCGTCCGAACTCCTCACTTATAGTC | |
| Diptericin-F | TTCTATTCATTGGACTGGCTTGTGC | 200 |
| Diptericin-R | GAGGCTCAGATCGAATCCTTGCTT | |
| Spn27A-F | GACAAAGATGGGCGGAAAT | 204 |
| Spn27A-R | CGGAAGGGCACAAAGGTAT | |
| MP2-F | ATGTTGCGGCACAAGGAAG | 101 |
| MP2-R | AGACTGCTGAATCACGGAAAG | |
| DOXA2-F | CCAGGCGGTGCTTATTAACTGT | 146 |
| DOXA2-R | TCCGACCTAGATAGTACAGGAAACG | |
| yellowf2-F | GGAGTATCCAAATAACCGCCAACAG | 226 |
| yellowf2-R | GTTTCGCAGGTGATAGACGTACAGG | |
| PPO1-F | GTGACCAATAATGGAGCCAGACG | 145 |
| PPO1-R | CAGGCACCAAATCAACTGTGAACT | |
| rp49-F | CACCGGATTCAAGAAGTTCC | 124 |
| rp49-R | GACAATCTCCTTGCGCTTCT | |

### 1.6 数据分析

实验数据均在 Data Processing System (DPS) Package Version 9.5 (Tang and Zhang, 2013) 中进行分析,使用的分析方法有非配对 Student 氏 $t$ 检验。设定 $0.01 < P < 0.05$ 为显著差异,$0.001 < P < 0.01$ 和 $P < 0.001$ 为极显著差异。最后用 Graphpad Prism 8.0.2 (GraphPad, San Diego, CA, United States) 软件进行绘图。

## 2 结果

### 2.1 日本开臂反颚茧蜂的发育历期及形态特征

日本开臂反颚茧蜂是一种幼虫-蛹寄生蜂,成熟的雌性寄生蜂将卵产在果蝇 2 龄幼虫体内,其蜂卵在 3 龄寄主幼虫体内孵化。待寄主发育至蛹期时,寄生蜂幼蜂通过大量取食蛹期寄主的组织并完成自身世代发育。日本开臂反颚茧蜂的发育经历卵、幼虫、蛹和成虫 4 个阶段。统计结果表明,在 25 ± 1℃ 的实验室饲养条件下,日本开臂反颚茧蜂的卵期发育需要 2.38 ± 0.01 d,幼虫期需要 5.36 ± 0.07 d,蛹期需要 8.30 ± 0.04 d (图 1)。由于本实验所用的日本开臂反颚茧蜂为孤雌生殖品种,因此上述实验数据均为雌性日本开臂反颚茧蜂生长发育所需的时间。

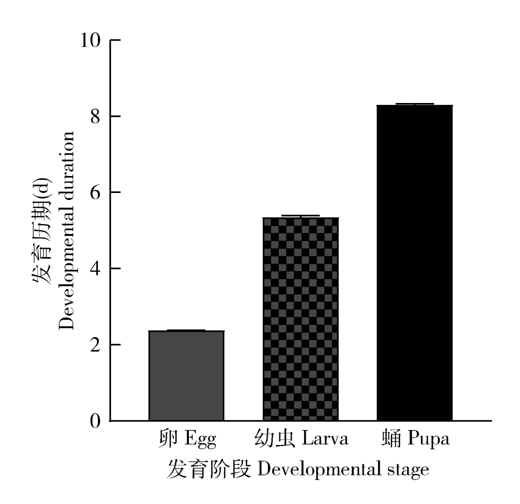



图 1 日本开臂反颚茧蜂各发育阶段发育历期

Fig. 1 Duration of various developmental stages of *Asobara japonica*

图中的数值为平均值 ± 标准误。Data in the figure are mean ± *SE*.

经过解剖成像,我们同时获得了日本开臂反颚茧蜂在寄主体内不同发育阶段的图片(图 2)。日本开臂反颚茧蜂卵呈香蕉形(图 2: A),在早期发育的

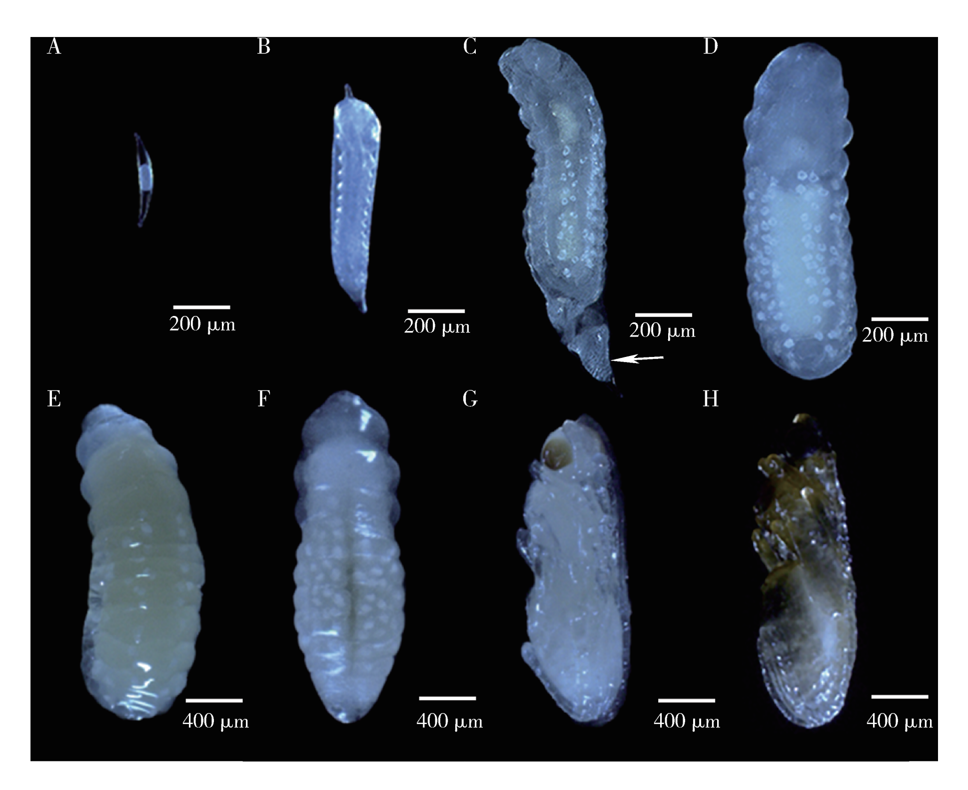



图 2 日本开臂反颚茧蜂各发育阶段的形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of *Asobara japonica* at different developmental stages

A: 卵 Egg; B: 1 龄幼虫初期 Early stage of the 1st instar larva; C: 2 龄幼虫初期 Early stage of the 2nd instar larva; D: 2 龄幼虫晚期 Late stage of the 2nd instar larva; E: 3 龄幼虫 3rd instar larva; F: 预蛹 Prepupa; G: 早期蛹 Early stage of pupa; H: 晚期蛹 Late stage of pupa. 箭头示1 龄幼蜂蜕下的表皮。The arrow indicates the cuticle exuviated by the 1st instar larva.

胚胎中可见明显的两层膜结构,产卵后约 2 d 已可见幼虫形态,之后其突破内膜发育为 1 龄幼虫。日本开臂反颚茧蜂幼虫阶段共分 3 个龄期,整个 1 龄幼虫阶段均在外膜内完成,发育初期的 1 龄幼虫可见轻微的体节分化,头部显著宽于体节,体色乳白色,肠道等结构尚不清晰(图 2: B);1 龄末期体节部分明显变宽,与头部等宽,肠道明显,约占整个虫体的二分之一,体色透明,且有少量脂肪颗粒积累。产卵后约 4 d,1 龄幼虫突破外膜,发育成 2 龄幼虫,能观察到明显的蜕皮(图 2: C)。随着寄生蜂 2 龄幼虫的生长,其肠道逐渐变成不透明的淡黄色,约占身体的 2/3,身体四周布满脂肪颗粒,体躯宽于头部(图 2: D)。产卵后 5 d,日本开臂反颚茧蜂体型较 2 龄幼虫明显变大,发育成 3 龄幼虫,幼虫身体弯曲,呈黄色,肠道几乎充满整个身躯(图 2: E)。在这一过程中,我们没有看到蜕皮,可能 2 龄幼虫蜕下的表皮被寄生蜂 3 龄幼虫快速消化并利用。随后,日本开臂反颚茧蜂幼虫进入预蛹及蛹期(图 2: F–H)。

## 2.2　日本开臂反颚茧蜂的寄生率及出蜂率

寄生蜂与寄主间存在着十分复杂的相互作用关系。一方面,寄生蜂会释放一些寄生因子使其成功寄生;另一方面,寄主会产生一系列的免疫应答,如包囊和黑化反应,最终会导致寄生蜂无法生长发育。在寄主黑腹果蝇上的寄生率及出蜂率,是决定其是否适用于大规模扩繁日本开臂反颚茧蜂并用于生物防治应用的关键因素。因此,我们对日本开臂反颚茧蜂寄生黑腹果蝇的寄生率和出蜂率进行了统计。研究结果表明,在实验条件下,日本开臂反颚茧蜂的寄生率为 94.9% ±4.0%,出蜂率为 64.3% ±7.1%(表 2)。同时,我们还发现,日本开臂反颚茧蜂寄生能够导致较高的寄主幼虫和蛹死亡率,分别为 25.8% ±3.7% 和 6.6% ±1.1%,而未寄生的对照组寄主幼虫和蛹死亡率很低,分别只有 4.1% ±1.4% 和 0(表 2)。

## 2.3　日本开臂反颚茧蜂寄生对黑腹果蝇生长发育的影响

我们对日本开臂反颚茧蜂调控寄主生长发育进行了初步的研究。通过每隔 12 h 统计寄主成功化蛹数,计算每个时间点的化蛹率,并采用 Student 氏 *t* 检验进行显著性分析。研究结果表明,日本开臂反颚茧蜂寄生后黑腹果蝇化蛹时间发生了显著延迟。在产卵后 5, 5.5 和 6 d,被寄生组化蛹率相较未被寄生对照显著降低($P<0.05$),其中在 50% 化蛹率这一节点上,寄生后的寄主化蛹时间延长了约 0.5 d(图 3)。结果显示,日本开臂反颚茧蜂寄生能够延缓黑腹果蝇的生长发育,和已报道的其他果蝇寄生蜂有相似的作用机制。

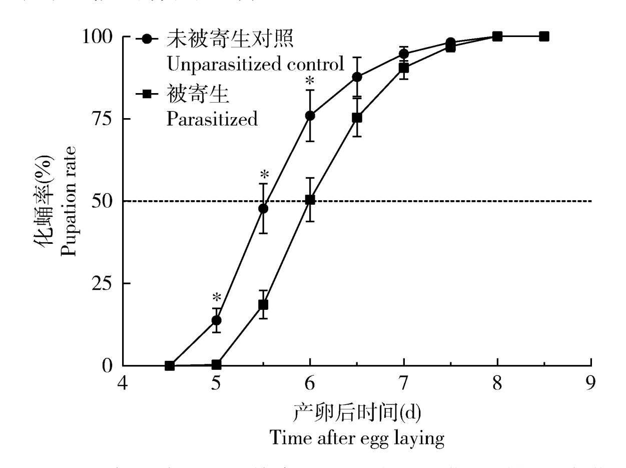



图 3　日本开臂反颚茧蜂寄生后黑腹果蝇化蛹时间的变化

Fig. 3　Changes of pupation time of *Drosophila melanogaster* after being parasitized by *Asobara japonica*

图中数据为平均值 ± 标准误;柱上星号表示同一寄生时间点被寄生组和未被寄生对照之间差异显著($P<0.05$, Student 氏 *t* 检验)。Data in the figure are mean ± *SE*. The asterisks above bars indicate significant difference between the parasitized group and the unparasitized control at the same time point post parasitization ($P<0.05$, Student's *t*-test).

## 2.4　日本开臂反颚茧蜂寄生对黑腹果蝇 Toll, Imd 和 PO 免疫通路关键基因的影响

为了弄清楚日本开臂反颚茧蜂寄生是否影响了寄主的免疫通路,我们选择果蝇 3 个主要免疫通路,即 Toll 通路、Imd 通路和 PO 通路,各通路分别选取 5 个重要基因进行转录水平检测。实验结果表明,寄生 6 和 12 h 后,Toll 通路中的基因 *SPE*, *Toll*, *Myd*88 和 *Dif* 表达量与未被寄生对照组比无显著变化($P>0.05$)(图 4: A–D),但该通路一个末端效应抗菌肽基因 *Drosomycin* 表达量显著上调($P<0.05$),其寄生后 6 h 相较未被寄生对照上调 53 倍,寄生后 12 h 相较未寄生对照上调 38 倍(图 4: E);寄生 6 和 12 h 后,Imd 通路中的基因 *PGRP-LE*, *PGRP-LC*, *imd* 和 *Relish* 表达量与未被寄生对照组比无显著差异($P>0.05$)(图 4: F–I),但一个末端效应抗菌肽基因 *Diptericin* 表达量显著上调($P<0.05$),其中寄生后 6 h 相较未被寄生对照上调 36 倍,寄生后 12 h 相较未被寄生对照上调 12 倍(图 4: J)。Toll 通路和 Imd 通路的一些上游基因的表达水平没有受到日本开臂反颚茧蜂寄生的影响,但是其下游的两个抗菌肽基因 *Drosomycin* 和 *Diptericin* 却显著上调。

在寄生 6 和 12 h 后, PO 通路基因 *Spn27A*,

**表 2　日本开臂反颚茧蜂寄生黑腹果蝇 2 龄幼虫后的寄生率、出蜂率、寄主幼虫死亡率和蛹死亡率**

**Table 2　Parasitism rate, emergence rate, mortality rate of host larvae and pupae of *Asobara japonica* after parasitization on the 2nd instar larvae of *Drosophila melanogaster***

| 重复 Repetitions | 供试寄主幼虫数 Number of host larvae | 寄主化蛹数 Number of host pupae | 寄主幼虫死亡数 Number of dead host larvae | 寄主幼虫死亡率(%)[a] Mortality rate of host larvae | 寄主羽化数 Number of emerged host adults | 寄生蜂羽化数 Number of emerged wasps | 寄主蛹死亡数 Number of dead host pupae | 寄主蛹死亡率(%)[b] Mortality rate of host pupae | 寄生率(%)[c] Parasitism rate | 出蜂率(%)[d] Emergence rate of wasps (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 被寄生 Parasitized | | | | | | | | | | |
| 1 | 200 | 148 | 52 | 26.0 | 2 | 135 | 11 | 7.4 | 99.0 | 67.5 |
| 2 | 200 | 144 | 56 | 28.0 | 13 | 121 | 10 | 6.9 | 93.5 | 60.5 |
| 3 | 200 | 159 | 41 | 20.5 | 6 | 145 | 8 | 5.0 | 97.0 | 72.5 |
| 4 | 200 | 143 | 57 | 28.5 | 20 | 113 | 10 | 7.0 | 90.0 | 56.5 |
| 均值 Average | 200 | 149 | 51 | 25.8 ± 3.7 | 10 | 129 | 10 | 6.6 ± 1.1 | 94.9 ± 4.0 | 64.3 ± 7.1 |
| 未被寄生对照 Unparasitized control | | | | | | | | | | |
| 1 | 200 | 188 | 12 | 6.0 | 188 | – | 0 | 0 | – | – |
| 2 | 200 | 191 | 9 | 4.5 | 191 | – | 0 | 0 | – | – |
| 3 | 200 | 194 | 6 | 3.0 | 194 | – | 0 | 0 | – | – |
| 4 | 200 | 194 | 6 | 3.0 | 194 | – | 0 | 0 | – | – |
| 均值 Average | 200 | 192 | 8 | 4.1 ± 1.4 | 192 | – | 0 | 0 | – | – |

[a]寄主幼虫死亡率 Mortality rate of host larvae = (寄主幼虫死亡数 Number of dead host larvae/供试寄主幼虫数 Number of host larvae) × 100%; [b]寄主蛹死亡率 Mortality rate of host pupae = (寄主蛹死亡数 Number of dead host pupae/寄主化蛹数 Number of host pupae) × 100%; [c]寄生率 Parasitism rate = [1 – (寄主羽化数 Number of emerged host adults/供试寄主幼虫数 Number of host larvae)] × 100%; [d]出蜂率 Emergence rate of wasps = (寄生蜂羽化数 Number of emerged wasps/供试寄主幼虫数 Number of host larvae) × 100%.

*MP*2, *yellow-f*2 和 *DoxA*2 表达量与未被寄生对照组比无显著差异（$P>0.05$）（图 4：K－N），但原酚氧化酶基因 *PPO*1 表达量发生显著下调（$P<0.05$），其中寄生后 6 h 相较未寄生对照下调 38%，寄生后 12 h 相较未被寄生对照下调 50%（图 4：O）。结果显示寄生蜂能够快速且有效抑制寄主的黑化反应，从而保证日本开臂反颚茧蜂具有很高的寄生效率。

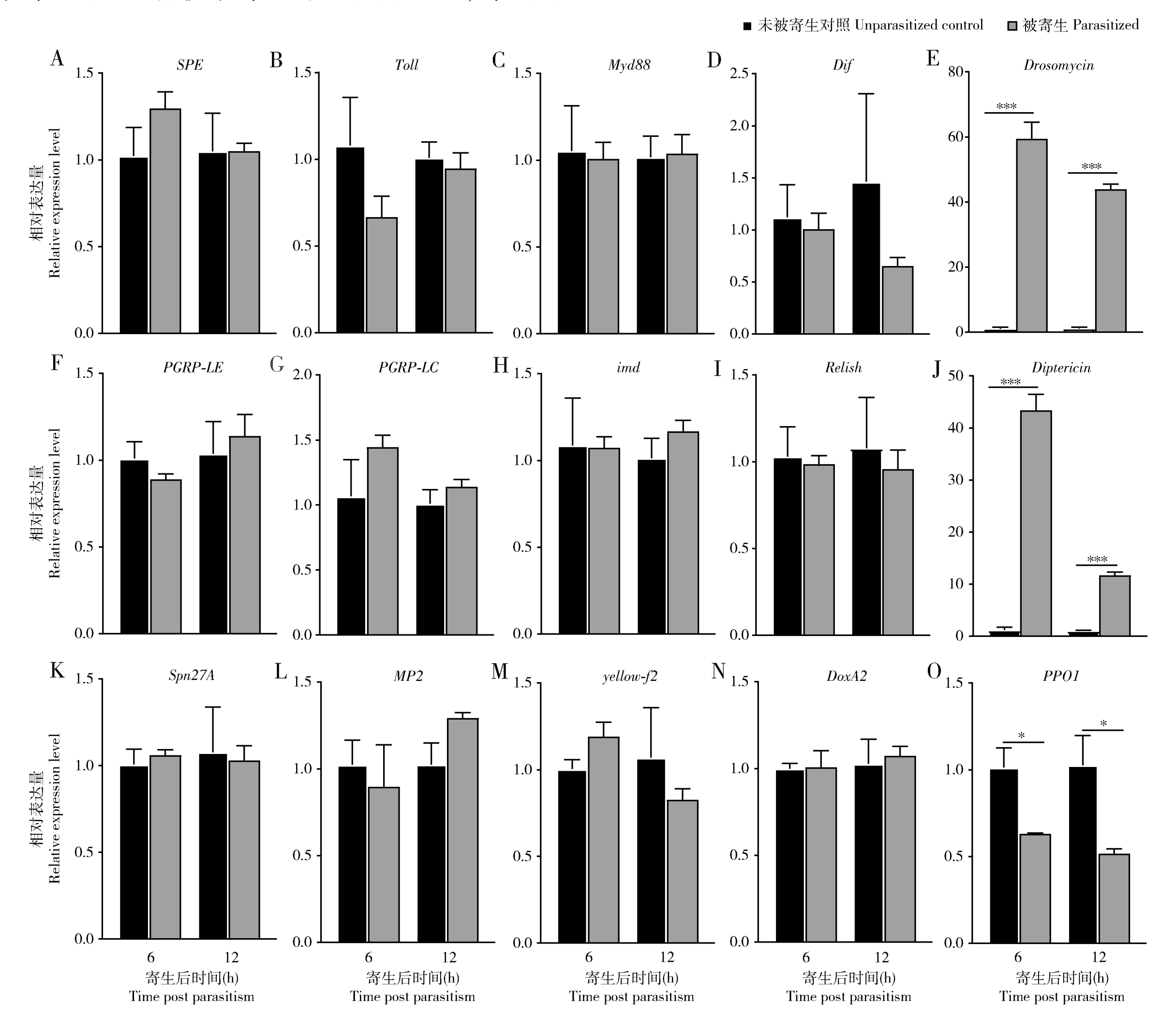



图 4　日本开臂反颚茧蜂寄生 6 和 12 h 后黑腹果蝇幼虫 Toll, Imd 和 PO 通路重要基因相对表达量变化

Fig. 4　Changes in relative expression levels of important genes of Toll, Imd and PO pathways in *Drosophila melanogaster* larvae after being parasitized by *Asobara japonica* for 6 and 12 h

A－E：分别为 Toll 通路中的 *SPE*, *Toll*, *Myd*88, *Dif* 和 *Drosomycin* 基因 *SPE*, *Toll*, *Myd*88, *Dif* and *Drosomycin*, respectively, involved in Toll pathway; F－J：分别为 Imd 通路中的 *PGRP-LE*, *PGRP-LC*, *imd*, *Relish* 和 *Diptericin* 基因 *PGRP-LE*, *PGRP-LC*, *imd*, *Relish* and *Diptericin*, respectively, involved in Imd pathway; K－O：分别为 PO 通路的 *Spn27A*, *MP*2, *yellow-f*2, *DoxA*2 和 *PPO*1 基因 *Spn27A*, *MP*2, *yellow-f*2, *DoxA*2 and *PPO*1, respectively, involved in PO pathway. 图中数值为平均值 ± 标准误；柱上星号表示同一寄生时间点被寄生组和未被寄生对照之间差异显著（Student 氏 $t$ 检验）。Data in the figure are mean ± *SE*. The asterisks above bars indicate significant difference between the parasitized group and the unparasitized control at the same time point post parasitization (Student's $t$-test). $^{*}0.01<P<0.05$; $^{***}P<0.001$.

## 3　讨论

日本开臂反颚茧蜂是果蝇的幼虫-蛹期寄生蜂。通过解剖与成像，我们对日本开臂反颚茧蜂羽化前的 6 个生长发育阶段（卵期、1 龄幼虫期、2 龄幼虫期、3 龄幼虫期、预蛹期和蛹期）进行了详细观察。在实验室条件下，日本开臂反颚茧蜂从卵发育到成虫需要 16 d 左右，其中卵期 2.38 ± 0.01 d，幼虫期 5.36 ± 0.07 d，蛹期 8.30 ± 0.04 d（图 1）。我们还发现日本开臂反颚茧蜂对黑腹果蝇寄生效率很高，平均寄生率为 94.9% ± 4.0%，平均出蜂率为 64.3% ± 7.1%（表 2）。同时，我们也发现寄生会引起黑腹果蝇在幼虫期和蛹期分别产生 25.8% 和 6.6% 的死亡率（表 2），推测其可能与日本开臂反颚茧蜂具有较强的毒液作用有关。有研究表明日本开

臂反颚茧蜂的毒液能导致寄主暂时麻痹瘫软,从而利于寄生蜂的产卵(Furihata and Kimura, 2009)。另外,Mitsui 等(2007)发现,在日本北部境内发现的日本开臂反颚茧蜂种群的生殖方式为产雌孤雌生殖,而在南部境内发现的日本开臂反颚茧蜂种群为有性生殖。因此,本实验室在浙江台州地区采集的日本开臂反颚茧蜂和日本北部境内的种群较为相似,可能都是由于胞内共生菌 *Wolbachia* 所导致的孤雌生殖(Kremer, 2009)。

日本开臂反颚茧蜂寄生黑腹果蝇后,果蝇的生长发育速度明显减缓,50% 寄主化蛹时,寄主幼虫化蛹时间延长了约 0.5 d,占整个幼虫发育期的 10%(图 3)。寄生蜂寄生引起寄主生长发育延缓这一现象在其他寄生体系中普遍存在,推测其可能满足寄生蜂自身生长发育所需要(周思聪等, 2018)。寄生蜂在寄生时通常会将一些寄生因子连同蜂卵一起注射至寄主体内,这些寄生因子包括毒液、多分 DNA 病毒、类病毒颗粒、畸形细胞、卵巢蛋白和幼蜂分泌物等(叶恭银等, 2019)。本实验室前期研究发现菜蛾盘绒茧蜂 *Cotesia vestalis* 会释放一些源于多分 DNA 病毒和畸形细胞的 microRNAs 至寄主小菜蛾 *Plutella xylostella* 体内,从而下调蜕皮激素受体的表达水平,最终延缓寄主的生长发育(Wang *et al.*, 2018)。有意思的是,日本开臂反颚茧蜂目前只发现有毒液这一种寄生因子,其毒液蛋白如何调控寄主的生长发育还需后续进一步的研究和探索。

寄生蜂往往采取不同的策略去克服寄主的免疫系统,进而成功寄生。其寄生策略主要包括免疫抑制型和免疫逃避型(Labrosse *et al.*, 2003)。所谓免疫抑制型,即寄生蜂通过寄生因子抑制寄主的免疫反应;而免疫逃避型,是指寄生蜂通过粘附或降低寄主识别等机制逃避寄主的免疫反应。果蝇寄生蜂 *L. boulardi* 寄生后引起寄主的大量蛋白裂解酶基因、Toll 和 JAK/STAT 信号通路相关基因以及黑化级联反应相关基因的显著上调,其免疫抑制机制不明显。它通过将卵粘附到寄主组织避免寄主的包囊反应,是一种典型的免疫逃避型策略。同一属的 *L. heterotoma* 寄生会引起果蝇寄主血细胞的裂解、造血器官淋巴腺消失和免疫相关基因的表达显著降低,免疫抑制作用明显,是一种典型的免疫抑制型策略(Schlenke *et al.*, 2007)。研究还发现,*L. heterotoma* 和 *L. boulardi* 毒液蛋白组分也存在明显差异,这可能与其采用的不同寄生策略有关(Colinet *et al.*, 2013)。本研究发现,当黑腹果蝇被日本开臂反颚茧蜂寄生后,与体液免疫相关的 Toll 和 Imd 通路的大部分基因表达没有变化,而抗菌肽基因 *Drosomycin* 和 *Diptericin* 表达量均显著上调,表明寄生可能导致 Toll 通路和 Imd 通路上游基因的编码蛋白磷酸化,使其编码蛋白活性发生改变(Lemaitre and Hoffmann, 2007; Tang, 2009),而非直接转录水平的影响。有意思的是,寄生蜂寄生不仅能提高寄主的抗菌能力,而且还能主动分泌一些抗菌肽协助寄主抵御病原微生物的感染,从而保证寄生成功(Gao *et al.*, 2016)。另外,寄生后,与黑化相关的原酚氧化酶基因 *PPO*1 表达量显著下调(图 4)。这个结果和日本开臂反颚茧蜂寄生后寄主果蝇无黑化反应的现象相一致,说明日本开臂反颚茧蜂通过下调寄主酚氧化酶(PO)活性,进而抑制寄主体液免疫能力。Furihata 等(2013)发现,向果蝇体内注射日本开臂反颚茧蜂的毒液,能引起抗菌肽基因表达量显著上调,这和我们的实验结果相吻合。这些结果表明,寄生蜂一方面通过下调寄主 PPO1 的表达,去抑制寄主黑化免疫反应;另一方面通过上调寄主抗菌肽,去增强寄主抵抗微生物感染的能力。正是由于这一反一正两种截然不同的免疫调节机制,才能保证寄生蜂后代在寄主体内正常发育。

本研究发现黑腹果蝇是日本开臂反颚茧蜂一种合适的规模化养殖替代寄主。日本开臂反颚茧蜂寄生黑腹果蝇后,通过延缓寄主的生长发育、抑制寄主的体液免疫以及提升寄主的抗菌能力,从而保障了很高的寄生效率。研究结果为大量繁殖与释放日本开臂反颚茧蜂,用以防治斑翅果蝇的危害,提供了必要的理论依据和技术支撑。

## 参考文献(References)


Atallah J, Teixeira L, Salazar R, Zaragoza G, Kopp A, 2014. The making of a pest: The evolution of a fruit-penetrating ovipositor in *Drosophila suzukii* and related species. *Proc. Biol. Sci.*, 281(1781): 20132840.

Carton Y, Boulétreau M, van Alphen JJ, van Lenteren JC, 1986. The *Drosophila* parasitic wasps. In: Ashburner M, Carson JL, Thompson JN eds. The Genetics and Biology of *Drosophila*. Academic Press, London. 347 – 394.

Chabert S, Allemand R, Poyet M, Eslin P, Gibert P, 2012. Ability of European parasitoids (Hymenoptera) to control a new invasive Asiatic pest, *Drosophila suzukii*. *Biol. Control*, 63(1): 40 – 47.

Cini A, Anfora G, Escudero-Colomar LA, Grassi A, Santosuosso U, Seljak G, Papini A, 2014. Tracking the invasion of the alien fruit pest *Drosophila suzukii* in Europe. *J. Pest Sci.*, 87: 559 – 566.

Colinet D, Deleury E, Anselme C, Cazes D, Poulain J, Azema-Dossat C, 2013. Extensive inter- and intraspecific venom variation in

closely related parasites targeting the same host: The case of *Leptopilina parasitoids* of *Drosophila*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 43 (7): 601 – 611.

Dang YQ, Wang XY, Yang ZQ, 2018. Advances in biological control of forest insect pests by using natural enemies in China. *J. Environ. Entomol.*, 40(2): 15 – 28. [党英侨, 王小艺, 杨忠岐, 2018. 天敌昆虫在我国林业害虫生物防治上的研究进展. 环境昆虫学报, 40(2): 15 – 28]

Furihata SX, Kimura MT, 2009. Effects of *Asobara japonica* venom on larval survival of host and nonhost *Drosophila* species. *Physiol. Entomol.*, 34(3): 292 – 295.

Furihata SX, Matsumoto H, Kimura MT, Hayakawa Y, 2013. Venom components of *Asobara japonica* impair cellular immune responses of host *Drosophila melanogaster*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 83 (2): 86 – 100.

Gao F, Gu QJ, Pan J, Wang ZH, Yin CL, Li F, Song QS, Strand MR, Chen XX, Shi M, 2016. *Costesia vestalis* teratocytes express a diversity of genes and exhibit novel immune functions in parasitism. *Sci. Rep.*, 6: 26967.

Gu DX, Zhang GR, Zhang RJ, Pang Y, 2000. Review on fifty-years biological control of insect pests in southern China. *Acta Entomol. Sin.*, 43 (3): 327 – 335. [古德祥, 张古忍, 张润杰, 庞义, 2000. 中国南方害虫生物防治 50 周年回顾. 昆虫学报, 43(3): 327 – 335]

Ideo S, Watada M, Mitsui H, Kimura MT, 2008. Host range of *Asobara japonica* (Hymenoptera: Braconidae), a larval parasitoid of drosophilid flies. *Entomol. Sci.*, 11(1): 1 – 6.

Kremer N, Charif D, Henri H, Bataille M, Prévost G, Kraaijeveld K, Vavre F, 2009. A new case of *Wolbachia* dependence in the genus *Asobara*: Evidence for parthenogenesis induction in *Asobara japonica*. *Heredity*, 103(3): 248 – 256.

Labrosse C, Carton Y, Dubuffet A, Drezen JM, Poirie M, 2003. Active suppression of *D. melanogaster* immune response by long gland products of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. *J. Insect Physiol.*, 49(5): 513 – 522.

Lee JC, Bruck DJ, Curry H, Edwards D, Haviland DR, Van Steenwyk RA, Yorgey BM, 2011. The susceptibility of small fruits and cherries to the spotted-wing drosophila, *Drosophila suzukii*. *Pest Manag. Sci.*, 67(11): 1358 – 1367.

Lemaitre B, Hoffmann J, 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.*, 25: 697 – 743.

Li HA, Wang X, Li X, Guo R, Zhang YF, 2007. The pilot studies on preventative method to greenhouse white fly by *Encarsia formosa* and yellow board. *Chin. Agric. Sci. Bull.*, 23(7): 475 – 477. [李洪安, 王萱, 李响, 郭锐, 张远芳, 2007. 丽蚜小蜂和黄板诱杀防治温室白粉虱研究初报. 中国农学通报, 23(7): 475 – 477]

Li ZX, Nie JY, Yan Z, Cheng Y, Lan F, Huang Y, Chen QS, Zhao XB, Li A, 2018. A monitoring survey and dietary risk assessment for pesticide residues on peaches in China. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 97: 152 – 162.

Mitsui H, Achterberg KV, Nordlander G, Kimura MT, 2007. Geographical distributions and host associations of larval parasitoids of frugivorous Drosophilidae in Japan. *J. Nat. Hist.*, 41(25 – 28): 1731 – 1738.

Schlenke TA, Morales J, Govind S, Clark AG, 2007. Contrasting infection strategies in generalist and specialist wasp parasitoids of *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathog.*, 3(10): 1486 – 1501.

Tang H, 2009. Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila*. *Fly*, 3(1): 105 – 111.

Tang QY, Zhang CX, 2013. Data Processing System (DPS) software with experimental design, statistical analysis and data mining developed for use in entomological research. *Insect Sci.*, 20(2): 254 – 260.

Wang ZZ, Ye XQ, Shi M, Li F, Wang ZH, Zhou YN, Gu QJ, Wu XT, Yin CL, Guo DH, Hu RM, Hu NN, Chen T, Zheng BY, Zou JN, Zhan LQ, Wei SJ, Wang YP, Huang JH, Fang XD, Strand MR, Chen XX, 2018. Parasitic insect-derived miRNAs modulate host development. *Nat. Commun.*, 9(1): 2205.

Whitfield JB, 2003. Phylogenetic insights into the evolution of parasitism in Hymenoptera. *Adv. Parasitol.*, 54: 69 – 100.

Ye GY, Hu J, Zhu JY, Fang Q, Yan ZC, Wang L, 2019. Recent advances in research on the mechanisms through which parasitoid wasps regulate host immunity and development. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 56(3): 382 – 400. [叶恭银, 胡建, 朱家颖, 方琦, 严智超, 王磊, 2019. 寄生蜂调控寄主害虫免疫与发育机理的研究新进展. 应用昆虫学报, 56(3): 382 – 400]

Zhang CL, Zhang YH, He WY, Huang JB, Zhou LY, Ning H, Wu ZP, Wang DN, Ke DC, 2011. Integrated control technology of cherry fruit flies and experimental demonstration in Aba, Sichuan province. *China Plant Prot.*, 31(10): 26 – 28. [张成林, 张永华, 何文英, 黄建斌, 周莉英, 宁红, 吴志平, 汪东宁, 柯大春, 2011. 阿坝州樱桃果蝇综合治理技术试验示范. 中国植保导刊, 31(10): 26 – 28]

Zhang HY, Ge YF, Hu X, Dong AS, Zou CS, Yang KJ, Wang LY, 2019. Occurrence dynamics of *Ostrinia furnacalis* in Nenjiang region of Heilongjiang province and the release of *Trichogramma dendrolimi* for its control. *Plant Prot.*, 45(3): 206 – 210, 229. [张海燕, 葛亚菲, 胡新, 董爱书, 邹长士, 杨克军, 王丽艳, 2019. 黑龙江省嫩江地区亚洲玉米螟发生动态及利用赤眼蜂防治研究. 植物保护, 45(3): 206 – 210, 229]

Zhang JJ, Ruan CC, Zang LS, Shao XW, Shi SS, 2015. Technological improvements for mass production of *Trichogramma* and current status of their applications for biological control on agricultural pests in China. *Chin. J. Biol. Control*, 31(5): 638 – 646. [张俊杰, 阮长春, 臧连生, 邵玺文, 史树森, 2015. 我国赤眼蜂工厂化繁育技术改进及防治农业害虫应用现状. 中国生物防治学报, 31(5): 638 – 646]

Zhang KC, Yan GH, Guo XJ, Wang J, Zhang XM, Zhou Y, 2014. Research review on spotted wing drosophila (*Drosophila suzukii*). *J. Fruit Sci.*, 31(4): 717 – 721, 750. [张开春, 闫国华, 郭晓军, 王晶, 张晓明, 周宇, 2014. 斑翅果蝇(*Drosophila suzukii*)研究现状. 果树学报, 31(4): 717 – 721, 750]

Zhang X, Li CQ, Pan ZQ, Zhu JC, Wang ZZ, Shi M, Chen XX, Huang JH, 2020. The complete mitochondrial genome of *Asobara japonica* (Hymenoptera: Braconidae). *Mitoch. DNA Part B*, 5(2): 1279 – 1281.

Zhou SC, Chen JN, Pang L, Pan ZQ, Shi M, Huang JH, Chen XX, 2018. Biological characteristics of *Leptopilina boulardi* (Hymenoptera: Figitidae) and the effects of its parasitism on the growth and development of *Drosophila melanogaster*. *Acta Entomol. Sin.*, 61(9): 1040 – 1046. [周思聪, 陈佳妮, 庞兰, 潘中秋, 时敏, 黄健华, 陈学新, 2018. 布拉迪小环腹瘿蜂的生物学特性及其寄生对黑腹果蝇生长发育的影响. 昆虫学报, 61(9): 1040 – 1046]

(责任编辑: 赵利辉)